

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-168355

(43)Date of publication of 16.06.1992
application :

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/404

G01N 31/00

(21)Application 02-294137 (71)Applic DAM SUIGENCHI KANKYO
number : ant : SEIBI CENTER

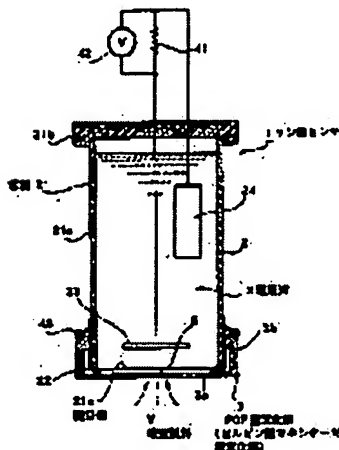
(22)Date of 31.10.199 (72)Invent KARUBE MASAO
filing : 0 or : KUBO IZUMI

(54) PHOSPHORIC ACID SENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To measure phosphoric acid ions dissolved in water to be inspected accurately by attaching oxidase-pyruvate-fixed film wherein pyruvate oxidase is fixed in a semitransparent-film state.

CONSTITUTION: This sensor is constituted of a dissolved oxygen electrode 2 wherein electrolyte X is sealed and a pyruvate-oxidase fixed film (POP-fixed film) 3. The electrode 2 has a container 21. In this container 21, a cathode plate 23 and an anode plate 24 are



arranged. A rising part 3b is formed at the periphery of a disk 3a on which the POP is fixed in the fixed film 3. The part 3b is coupled with the lower end of the container 21. Thus, the part is attached to the electrode 2. A detecting part 5 is formed between the fixed film 3 and a gas dialysis film 21. In the detecting part 5, oxygen dissolved in a buffer solution and phosphoric acid in a sample Y to be inspected oxidize pyruvic acid with the POP contained in the fixed film 3 as catalyst and form phosphoric acid. Thus, the oxygen and the phosphoric acid in the sample are consumed. Here, the current across both electrodes 23 and 24 is decreased by the consumption of the oxygen. Since the phosphoric acid and the oxygen are consumed at a constant rate by reaction, the content of the phosphoric acid can be detected when the amount of the current is monitored.

LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of
rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal]

against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平8-20401

(24) (44) 公告日 平成 8 年 (1996) 3 月 4 日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327				
27/416	Z A B			
27/49				
			G 0 1 N 27/ 30	3 5 3 P
			27/ 46	3 0 6
			請求項の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平2-294137	(71) 出願人	999999999 財団法人ダム水源地環境整備センター 東京都千代田区麹町2-14-2 麹町NKビル
(22) 出願日	平成2年(1990)10月31日	(72) 発明者	軽部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16
(65) 公開番号	特開平4-168355	(72) 発明者	久保 いづみ 東京都豊島区駒込1-6-3
(43) 公開日	平成4年(1992)6月16日	(74) 代理人	弁理士 森 哲也 (外3名)
		審査官	能美 知康
		(56) 参考文献	特開 昭59-216586 (J P, A) 特開 昭59-180353 (J P, A)

(54) 【発明の名称】 リン酸センサ

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検査試料を接触させる側に開口部を設けた容器内に電極板を配置し、前記開口部を酸素を透過させるガス透析膜で塞ぎ、当該電極板が浸る量の電解液を前記容器内に封入して溶存酸素電極を構成するとともに、前記ガス透析膜の外側には、ビルビン酸オキシダーゼを半透膜状に固定化したビルビン酸オキシダーゼ固定化膜を所定の空間を開けて取り付けたことを特徴とするリン酸センサ。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

この発明は、例えば河川や湖沼等の水中に溶存しているリン酸イオンの濃度を測定するセンサに関する。

【従来の技術】

現在、水質管理上、河川や湖沼等の富栄養化の一因と

2

なりうるリン酸を測定することは、重要な作業となっている。そして、従来、水中に溶存しているリン酸イオン濃度の定量法としては、吸光光度法、容量法、原子吸光法、重量法等の測定方法が知られている。

まず、吸光光度法の中には、モリブドリン酸法、モリブデンブルー法、バナドモリブドリン酸法等がある。これらの測定法は、各試薬をリン酸に反応させた後、それぞれの反応物質特有な波長の吸収光を当てて吸光度を測り、その結果からリン酸イオンの含有量を測定する方法である。

10

また、容量法は、反応の終点まで濃度既知の塩基を加えその容量を測定することにより、リン酸イオンの含有量を測定する方法であって、中和滴定や、キレート滴定等がある。

さらに、原子吸光法は、一旦、リン酸をモリブデン酸

アンモニウムとして沈澱させ、これを濾過し、再び溶解させてモリブデンを原子吸光で定量する方法であり、また重量法は、マグネシア混液中でマグネシウムと沈澱を生じさせたのち、焼成して $Mg_2P_2O_7$ を秤量する方法である。

〔発明が解決しようとする課題〕

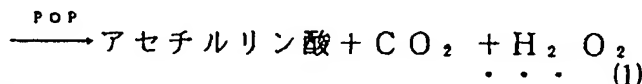
しかしながら、上記吸光光度法では、測定物質の固有波長に近似した波長を有する他の物質の影響を受けるため、正確な測定値を得られ難いという不具合がある。

一方、容量法、原子吸光法、重量法などは正確な定量を行えるが、同測定を行うためにはサンプルの測定設備が整った施設が必要があるなど、リアルタイム測定が不可能であって、測定水域の水質を即時に把握し、迅速な対応を行う所定水域の水質管理作業には適さないという不具合もある。

そこで、この発明はこのような点を考慮してなされたものであり、本発明の目的は、被検査水中に溶存しているリン酸イオンを、他の物質の影響を受けることなく正確に測定することができ、且つ同測定作業をリアルタイムに行うことができるリン酸センサを提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

ピルビン酸 + $H_2O + O_2$ + リン酸



ここで、同固定化膜は半透膜であり、基質や水、補酵素のような低分子を充分透過させ、酵素のような高分子を透過させることはない。従って、酵素は半透膜から外へ透過することはないのに対して、緩衝液および検査試料に含まれる前記(1)式の反応物質は半透膜を容易に透過し、もって固定化POPと前記反応物とが前記空間において接することになり、上記反応が生じて緩衝液中の酸素が消費される。

一方、電極板に生じる起電力は緩衝液中の酸素の溶存量に依存し、これに従って線型に変化する(溶存酸素が減少すれば、電流量も減少する)から、検査試料投入による溶存酸素電極の電流の減少量を測定することにより、検査試料中に溶存しているリン酸イオンの濃度の測定が可能となる。

なお、緩衝液中には上記反応を促進させるために、補酵素としてフラビンアデニンヌクレオチド(FAD)及びデアミンピロリン酸(TPP)を適量投入しておく。

〔実施例〕

次に、本発明の一実施例を第1図乃至第3図に基づいて説明する。本実施例は、河川や湖沼透の水質管理に利用されるものであり、検査試料のリン酸イオン濃度の測定を短時間で行うことを目的としたセンサである。

* この発明は、検査試料を接触させる側に開口部を設けた容器内に電極板を配置し、前記開口部を酸素を透過させるガス透析膜で塞ぎ、当該電極板が浸る量の電解液を前記容器内に封入して溶存酸素電極を構成するとともに、前記ガス透析膜の外側には、ピルビン酸オキシダーゼを半透膜状に固定化したピルビン酸オキシダーゼ固定化膜を所定の空間を開けて取り付けたことを特徴とするリン酸センサを構成することにより、上記課題を解決している。

10 〔作用〕

本発明のリン酸センサを酸素及びピルビン酸を溶存させている緩衝液中に浸漬し、さらに検査試料を投入する。

ここで、このリン酸センサのガス透析膜の外側に所定の空間を開けて取り付けられるピルビン酸オキシダーゼ固定化膜は、ピルビン酸オキシダーゼ(以下、POPという)を半透膜に固定したものである。そして、同酵素は下記(1)式に示す反応を触媒する酵素であって、前記空間において、酸素を酸素受容体としてピルビン酸を酸化すると同時にリン酸化し、アセチルリン酸、二酸化炭素、過酸化水素を生成させる作用を促進させる。

20 *

第1図に、本実施例のリン酸センサの側断面図を示す。このリン酸センサ1は、電解液Xを封入した溶存酸素電極2と、ピルビン酸オキシダーゼ固定化膜(以下、POP固定化膜という)3とにより構成される。

30

溶存酸素電極2は、容器21を有し、この容器21は円筒状の本体21aと、上部を覆う蓋体21bとにより構成され、その下端の開口部21cは酸素を透過させるガス透析膜22によって塞いでいる。また、この容器21内には、プラチナ(Pt)により形成された陰極板23と、鉛(Pb)により形成された陽極板24を配置しており、容器21内に充たされた電解液Xが両電極23,24のブリッジの役割を果たしている。なお、電解液Xとしては、例えば30%水酸化カリウム溶液を用いる。

40

また、両電極23,24に接続されるリード線23a,24aは、容器21外部で抵抗41を介して短絡されており、この抵抗41と並列に電圧計42を接続している。

POP固定化膜3は、POPを定着させた円板3aの周縁に立設部3bを形成してなり、これを前記容器21の下端に嵌め込み、Oリング43で立設部3bを締め付けることにより溶存酸素電極2のガス透析膜21の外側に、所定の空間5を開けて取り付けられている。この空間5において、緩衝液中の酸素およびピルビン酸と検査試料Y中のリン酸とが反応するようになっている。以下、この空間5を反応部5

50

と称する。

本実施例においては、POP固定化膜3は以下の工程により調製している。まず0.2mlのPOP,30Uを0.1モルTris-malate緩衝液に溶解し、0.8mlの光架橋性ポリビニルアルコール（商品名PVA-SbQ,東洋合成製）11%溶液と混合し、これを透析膜上に展開する。そして、室温で、暗所において5時間程度風乾させ、紫外線を照射してPOP固定化膜を製造する。このように製造されたPOP固定化膜は、半透膜状になり、基質や水、補酵素のような低分子を十分に透過させる一方、酵素のような高分子を透過させない。

なお、POPの固定化法としては、このほか共有結合法、吸着法、包括法などの調製法が知られているが、ビルビン酸オキシダーゼを半透膜状に固定化した固定化膜が、前述のように、半透膜である透析膜などの上に従来の固定化法で形成される固定化膜が貼り合わされた構造のものである場合には、前記調製法を用いて半透膜上の固定化膜を調製してもよい。

次に、本実施例の作用を第1図乃至第3図に基づいて説明する。

このリン酸センサ1を、酵素、 10^{-3} モルのTPP（補酵素）、 10^{-3} モルのFAD（補酵素）、0.5mモルのビルビン酸を含有する0.1モルTris-malate緩衝液に浸漬し、その後、所定量の検査試料Yを投入すると、これら緩衝液及び検査試料YはPOP固定化膜3を透過して反応部5に進入する。このとき、緩衝液中の酵素分子はガス透過膜22を通過して白金電極たる陰極板23に働きかけ、同表面で電子が消費されるために陰極板23と陽極板24の間に酸素の溶存量に比例した電流が流れる。

なお、抵抗41と電圧計42とを並列に接続し、且つ抵抗41の抵抗値が既知であるから、この電圧を測定することにより両極間の電流量は容易に求めることができる。

一方、反応部5においては前記(1)式の反応が促進される。すなわち、緩衝液中に溶存する酸素及び検査試料Y中のリン酸は、POP固定化膜3に含有されたPOPを触媒としてビルビン酸を酸化及びリン酸化させ、消費される。

ここで、両電極間の電流は、酸素が消費されることにより減少するが、上記反応によりリン酸と酸素は一定の割合で消費される（リン酸1モルに対して酸素1モルが消費される）ために、同電流量をモニタすれば、容易にリン酸の含有量を検出することができる。

第2図は、上記作用を踏まえて実際の実験より得られた、リン酸イオン濃度と電流減少量との特性を示すグラフである。すなわち、電圧計42を用いて算出した電流減少量を同グラフの検量線に対応させることにより、容易にリン酸イオンの濃度を検出することができる。

第3図は、リン酸センサの応答特性の実験結果を示すグラフである。同実験は、リン酸イオン濃度の異なる（10mM,20mM）の検査試料について行い、比較資料とし

である。同図に示すように、リン酸イオン濃度が高い検査試料の方が電流減少量が大いことがわかるが、いずれの場合も検査試料Yの投入時点Aから、3～4分で電流量は安定し、短時間でリン酸イオン濃度の検出が可能となることがわかる。

従って、本実施例によれば、同リン酸センサを緩衝液に浸漬し、検査試料を投入するだけで容易にリン酸イオン濃度を検出することができ、さらにセンサの反応時間も短いためにリアルタイムの測定が可能となる。

また、本実施例のリン酸センサ1は、ビルビン酸オキシダーゼ固定化膜3としてビルビン酸オキシダーゼを半透膜状に固定化したものを使用しているため、リン酸センサ1の外側にビルビン酸オキシダーゼが透過することはほとんどない。その結果、前記(1)式の反応の促進作用が長期間低下しないため、長期に渡ってリン酸イオン濃度を精度良く検出することができる。

なお、本実施例では、水質管理の対象となる湖沼や河川から検査試料をサンプリングして持ち帰り、リン酸イオン濃度を検出する作業を行っているが、例えば、同リン酸センサをpHセンサや水温センサ等と複合させてセンサボックスに収め、このセンサボックス自体にサンプリング構造を持たせれば、サンプリングと同時に同濃度を検出することも可能である。

〔発明の効果〕

以上説明したように、本発明のリン酸センサによれば、半透膜状にビルビン酸オキシダーゼを固定化したビルビン酸オキシダーゼ固定化膜が酸素及びリン酸を特定して反応させるために、被検査水中に溶存しているリン酸イオン濃度を他の物質の影響を受けることなく正確に測定することができ、同時に、同センサの反応時間が短いためにこの測定作業をリアルタイムに行うことができる。

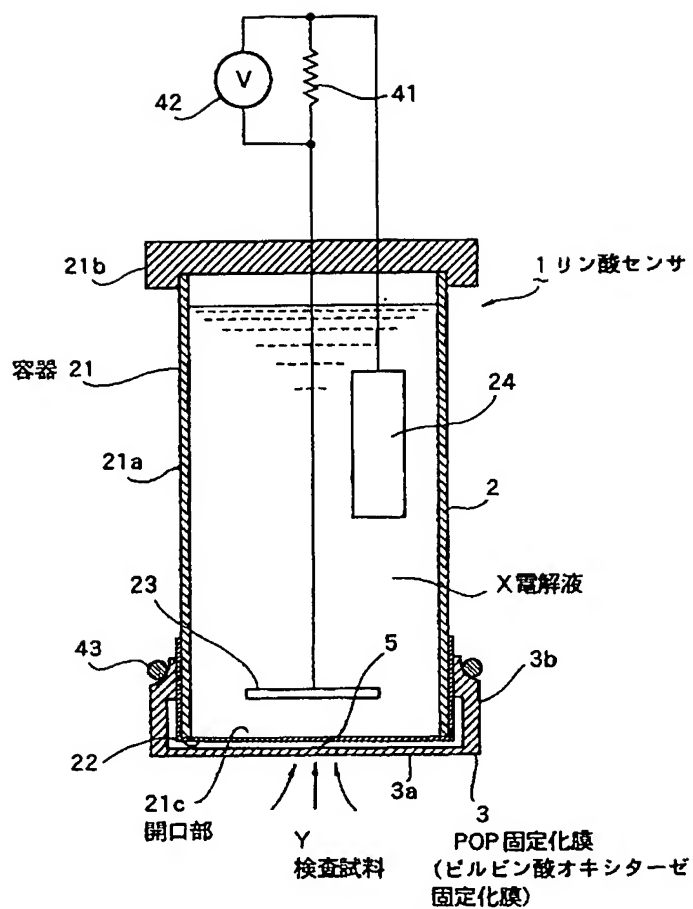
特に、本発明のリン酸センサで使用するビルビン酸オキシダーゼ固定化膜がビルビン酸オキシダーゼを半透膜状に固定化したものであるため、センサの外側にビルビン酸オキシダーゼが透過することはほとんどない。その結果、前記(1)式の反応の促進作用が長期間低下しないため、本発明のリン酸センサを用いれば、長期に渡ってリン酸イオン濃度を精度良く検出することができる。

〔図面の簡単な説明〕

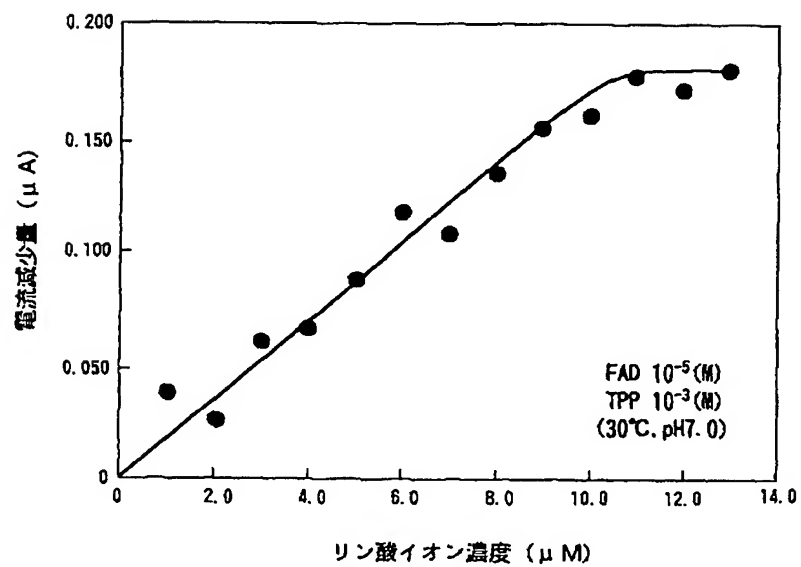
第1図は実施例のリン酸センサの側断面図、第2図はリン酸イオン濃度と電流減少量との特性を示すグラフ、第3図はリン酸センサの応答特性の実験結果を示すグラフである。

1……リン酸センサ、2……溶存酸素電極、21……容器、21c……容器の開口部、23……陰極板（電極板）、24……陽極板（電極板）、3……ビルビン酸オキシダーゼ固定化膜、5……反応部（空間）、X……電解液、Y……検査試料

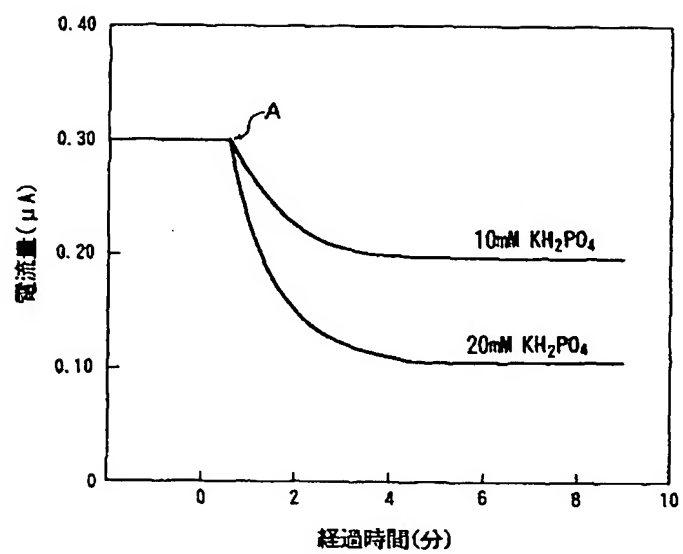
【第1図】



【第2図】



【第3図】



フロントページの続き(51)Int.Cl.⁶

// C 1 2 Q 1/26

G 0 1 N 31/00

識別記号

弁内整理番号

F I

技術表示箇所

6807-4B

N

G 0 1 N 27/46

Z A B